Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Entwicklung eines fluoreszenzimmunologischen Assays zur Messung kleiner IgG-Konzentrationen in Lymphozytenkulturen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
GUDRUN BRUNNER
aus Albstadt

1985

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Entwicklung eines fluoreszenzimmunologischen Assays zur Messung kleiner IgG-Konzentrationen in Lymphozytenkulturen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
GUDRUN BRUNNER
aus Albstadt

1985

Dekan:	Professor Dr. H. D. Waller
1. Berichterstatter:	Professor Dr. P. A. Berg
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H.-J. Gerth

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Herrn Professor Dr. P.A. Berg möchte ich sehr herzlich danken für die Anregung zu diesem Thema, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die großzügige Unterstützung der Arbeit.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. Brattig für die sachkundige Anleitung zu diesem Thema.

Frau E.M. Jauker danke ich für die perfekten Zeichnungen, ebenso Frau R. Bischof für die Reinschrift der Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG 1

MATERIALIEN UND METHODE 3

1. Materialien 3
1.1 Reagenzien 3
1.2 Geräte und weiteres Material 4

2. Methode 5
2.1 Das FIAX^{TM}/Stiq^{TM}-System 5
2.2 Testablauf 6
2.3 Messung 8

ERGEBNISSE 9

1. Beschichtung des Cellulose-Trägers mit anti-human-IgG 9

2. Ermittlung der optimalen anti-IgG-Konzentration 12

3. Einfluß eines Zusatzes von TWEEN 20 bzw. BSA zum Waschpuffer 14

4. Einfluß der Inkubationszeiten 18

5. Austestung des optimalen FITC-markierten Antikörpers 20

6. Vergleich von Standard-IgG und reinem IgG 22

7. Einfluß des Kulturmilieus auf die Eichkurve 24
7.1 Eichkurven in kulturadaptierten Lösungen 24
7.2 Verwendung von doppelseitigen Stiqs 26
7.3 Ermittlung der optimalen Arbeitsverdünnung 28

DISKUSSION 30

ZUSAMMENFASSUNG 36

LITERATURVERZEICHNIS 37

ABKÜRZUNGEN

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FCS	Fötales Kälberserum
FIAX	Fluorescent immuno assay
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FSU	Fluorescence signal units
PWM	Pokeweed Mitogen
Stiq	Surface technique for immuno quantitation

EINLEITUNG

Die Regulation der Immunantwort ist ein komplexes Zusammenspiel aus Aktivierung und Inhibition. Diese Funktionen werden hauptsächlich von Sub-Populationen der T-Lymphozyten übernommen, sogenannten Helfer- bzw. Suppressorzellen.

Suppressorzellen beim Menschen konnten erstmals von Waldmann et al. (1974) nachgewiesen werden. Er stellte bei Patienten mit Hypogammaglobulinämie eine erhöhte Suppressorzellaktivität fest. Das bedeutet, daß die Immunglobulinsynthese durch Suppressorzellen gehemmt wird: die T-Zell-Funktion beeinflußt die B-Zell-Funktion. Damit war es umgekehrt auch möglich, anhand der Immunglobulinsynthese der B-Zellen die Suppressorzellaktivität zu messen.

Zur Erfassung dieser in vitro synthetisierten Immunglobuline sind verschiedene Methoden entwickelt bzw. angewendet worden, wie Hämolytische Plaque Tests (Jerne und Nordin 1963; Fauci und Pratt 1976; Ginsburg et al. 1978), das von Engvall und Perlmann 1971 entwickelte ELISA-Verfahren (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay) und der Radioimmunoassay, den Plauth 1981 anwandte.

Er benutzte zum Nachweis der Suppressorzellaktivität die durch Pokeweed Mitogen stimulierte Immunglobulinsynthese. Dabei war es notwendig, ein empfindliches Meßverfahren zu entwickeln, um die in diesen Zellkulturen gebildeten geringen Mengen an Immunglobulin genau bestimmen zu können. Er verwendete einen Festphasen-Radioimmunoassay im Mikrotitersystem, der auf der von Catt und Tregear 1967 beschriebenen Methode basierte. Dieser wies zwar eine ausreichende Empfindlichkeit auf, war jedoch mit gewissen Nachteilen behaftet: dem relativ hohen zeitlichen und technischen Aufwand, der Instabilität der Reagenzien und der Belastung der Umwelt mit radioaktiver Strahlung.

Es stellte sich daher die Frage nach einem anderen Meßverfahren gleicher Sensitivität, jedoch ohne den erwähnten Nachteilen des RIA.

Dazu wurde ein fluorimetrischer Assay ausgewählt; speziell handelte es sich dabei um den neuen quantitativen Festphasen-Fluoreszenz-Immunoassay (FIA), der von International Diagnostics Technology 1977 entwickelt wurde.

Über die Anwendung dieses FIAX^{TM}-Systems wurde mehrfach berichtet: Ross (1978) untersuchte Anti-DNA-Antikörper im Serum von Patienten mit systemischem Lupus erythematodes. Casavant (1979) verglich den FIAX-Assay mit dem herkömmlichen Verfahren der Indirekten Immunfluoreszenz bei der Messung antinukleärer Antikörper im menschlichen Serum.

In weiteren serologischen Untersuchungen über Toxoplasmose (Walls und Barnhart 1977), Amöbiasis (Taylor und Perez 1978) und Röteln (Brody et al. 1979) wurde der FIAX-Test angewandt, darüber hinaus auch zur Messung von IgG und Albumin in Liquor cerebrospinalis (Stevens et al. 1979).

In der vorliegenden Untersuchung wurde ein Verfahren entwikkelt, welches es ermöglicht, das FIAX-System auch zur Messung von Immunglobulin G in Überständen PWM-stimulierter Lymphozyten anzuwenden.

MATERIALIEN UND METHODE

1. Materialien

1.1 Reagenzien

Medien und Puffer

- Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), Phosphate 0,1 m und 0,01 m, NaCl 0,15 m, pH 7,2
- TRIS-Puffer 0,5 % und 0,05 %, pH 7,2
- RPMI 1640 (1x) mit Hepes 25 mmol, mit L-Glutamin, Gibco-Labs. (Kat.Nr. 240)
- Fötales Kälberserum (FCS), Seromed
- Pokeweed Mitogen (PWM), Gibco Labs. (Kat.Nr. 536)

Seren

- Kaninchen anti-human-IgG(γ-Ketten)-Globulin, DAKO (Code 10-090) Lot 128 C und Lot 010 A
- Kaninchen anti-human-IgM(μ-Ketten)-Globulin, DAKO (Code 10-091) Lot 089 B
- Human IgG-Standard, Behring OTRA 07, Lot A 4102 A, Lot B 4203 F, Lot A 4202 A, Lot A 4302 A, Lot B 4303 F
- Human IgM-Standard, Behring OTRC 07, Lot 046105 N
- Human-IgG chromatographisch gereinigt, Nordic
- Protein-Testmischung 8, Serva (Kat.Nr. 30 086)
- Protein-Standard-Serum B, Nr. 1, Behring OTFG 07, Lot 043105 P
- Ziege anti-human-Ig(GAM)-Fluoreszein-Konjugat, F/P 3,4 Behring, Lot 128 006 A, Lot 128 006 C
- Kaninchen anti-human-IgG-Fluoreszein-Konjugat, F/P 2,0 Behring, Lot 128 804 C
- Ziege anti-human-Ig(GAM)-Fluoreszein-Konjugat, F/P 3,0 Behring, Lot 8002 A
- Kaninchen anti-human-Ig(GAM)-Fluoreszein-Konjugat, F/P 2,0 Behring, Lot 130 101 B

- Schaf anti-human-IgG-Fluoreszein-Konjugat, F/P 4,3 Wellcome, Lot K 4715
- Kaninchen anti-human-Ig-Fluoreszein-Konjugat, F/P 3,0 Behring, Lot 127 907 B
- Ziege anti-human-IgG(γ-Ketten)-Fluoreszein-Konjugat, F/P 3,2 Behring, Lot E 606 B, Lot E 606 F
- Kaninchen anti-human-IgG(γ-Ketten)-Fluoreszein-Konjugat, F/P 2,3 DAKO (Code F 1090), Lot 039 A, Lot 070, Lot 089 A, Lot 090 A, Lot 040 A
- Kaninchen anti-human-IgM(μ-Ketten)-Fluoreszein-Konjugat, F/P 2,3 DAKO (Code F 1091), Lot 099 D

Weitere Reagenzien

- Bovines Serum-Albumin (BSA), Sigma (Kat.Nr. A-6003), Lot 97 C-7444
- Tween 20 rein, Serva (Kat.Nr. 37470)

1.2 Geräte und weiteres Material

- Polypropylenröhrchen 12 x 75 mm, Greiner (Kat.Nr. 115213)
- Polypropylenröhrchen 16 x 100 mm, Greiner (Kat.Nr. 2170)
- Plastikröhrchen (50 ml), Falcon Plastics, Becton and Dickinson, Oxnard, USA (Kat.Nr. 2070)
- FIAX^{TM}-Leerstiqs, Cellulose-Oberfläche (Proteine), IDT 1seitig (Kat.Nr. 542251) und 2seitig (Kat.Nr. 542451)
- FIAX^{TM}-Ständer, IDT (Kat.Nr. 132)
- FIAX^{TM}-Klemme, IDT (Kat.Nr. 131)
- FIAX^{TM}-130 Spezial-Schüttelmaschine, IDT (Kat.Nr. 512051)
- FIAX^{TM}-100 Fluorometer, IDT (Kat.Nr. 511715)

2. Methode

2.1 Das FIAX^{TM}/Stiq^{TM}-System

Die Technik der Immunfluoreszenz zur Bestimmung von Antikörpern wurde erstmals von Coons et al. 1941 beschrieben. Die Methode basiert auf der Reaktion zwischen einem Antigen und einem spezifischen Antikörper, der mit einem fluoreszeierenden Farbstoff (Fluoreszein-Isothiocyanat; FITC) markiert ist (Konjugat).

Prinzip des FIAX-Systems (FIAX = Fluorescent Immuno Assay) ist, daß Antikörper an eine feste Phase adsorbiert werden, diese in der Testlösung enthaltenes Antigen binden, und das gebundene Antigen mit einem zweiten, FITC-markierten Antikörper reagiert. Die Bindungsrate dieses markierten Antikörpers entspricht der Konzentration des Antigens. Die feste Phase, die Proteine adsorbieren kann, ist eine mit Celluloseacetat beschichtete Reaktionsfläche auf einem Probenträger (Stiq). Es gibt einseitig und beidseitig beschichtete Stiqs.

Dieses FIAX-System hat sich als geeignet erwiesen, auch sehr kleine Konzentrationen von Immunglobulin zu erfassen. Zur Bestimmung von IgG in Kulturüberständen verwendet man an der festen Phase gebundenes anti-human-IgG; das Antigen ist in diesem Falle IgG und der markierte Antikörper FITC-anti-human-IgG.

2.2 Testablauf

Der Probenträger wird nacheinander in verschiedenen Lösungen inkubiert. Bei diesen Lösungen handelt es sich um:

1. Antikörper (anti-human-IgG)
2. Waschpuffer (PBS)
3. Antigen (IgG im Kulturüberstand)
4. Waschpuffer (PBS)
5. FITC-markierter Antikörper (FITC-anti-human-IgG)
6. Waschpuffer (PBS)

Die zu messende Substanz befindet sich in der dritten Lösung. In unserem Falle handelt es sich dabei um humanes Immunglobulin G.

Der unbehandelte Stiq wird zunächst in die erste Lösung eingetaucht. Dabei werden die Antikörper an die Celluloseacetatoberfläche adsorbiert (Abb. 1A). Im anschließenden Waschgang wird schwach gebundener Antikörper entfernt. In der dritten Lösung bindet sich das Antigen an den Antikörper. Auf der Reaktionszone befinden sich jetzt Antigen-Antikörper-Komplexe (Abb. 1B). Im folgenden Waschgang wird unspezifisch gebundenes Antigen entfernt. In der fünften Lösung binden sich an freie Bindungsstellen des Antigens FITC-markierte Antikörper und es bilden sich dadurch "Sandwich"-Immunkomplexe (Abb. 1C). Im letzten Waschgang werden alle unspezifisch gebundenen Proteine entfernt.

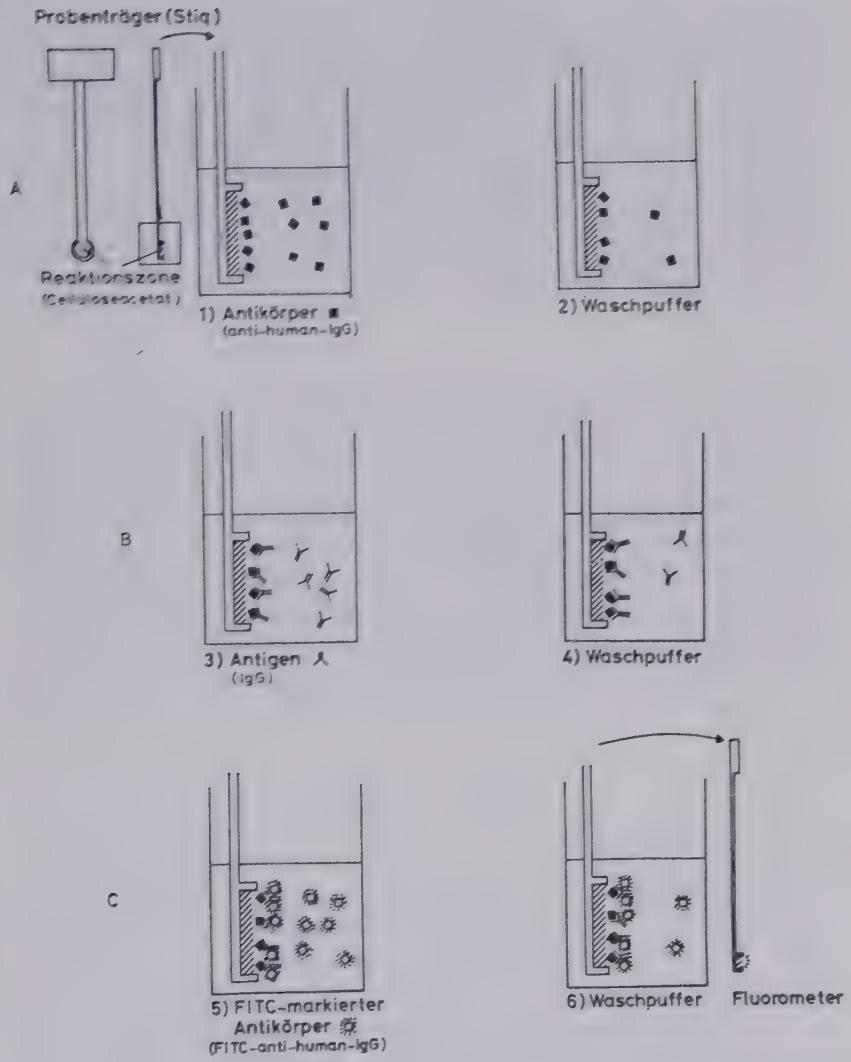

Abb. 1 Testablauf und Reaktionsprinzip der FIAX^{TM}-Methode zur Messung von IgG in Kulturüberständen

2.3 Messung

Die Konzentration von gebundenem FITC-Antikörper wird mit einem Fluorometer gemessen. Bei diesem Gerät wird mit Hilfe eines hochleistungsfähigen optischen Systems mit entsprechender Interferenzfilterkombination eine Empfindlichkeit erreicht, die es möglich macht, Picogramm von FITC auf der Stiqoberfläche zu erfassen. Die Emissionsintensität der auf dem Stiq befindlichen FITC-Immunkomplexe wird auf diese Weise in Fluoreszenz-Signale (Fluorescence Signal Units; FSU) umgesetzt, die digital angezeigt werden. Der Bereich umfaßt 0 - 200 FSU.

Vor der Messung des ersten Stiqs wird die Anzeige auf "O" justiert. Dann wird ein Stiq hineingeschoben; das angegebene Signal ist der sogenannte "pregain", der zwischen 15 und 50 FSU liegen sollte. Dieser läßt sich mit einem Multiplikationsfaktor auf ein bestimmtes Signal verstärken, in unserem Falle 180 FSU. Die Verstärkung ("gain") wird zur Messung der vorgesehenen Reihe von Stiqs konstant gehalten. Für die Verstärkung gilt, daß negative und niedrig positive Proben sich um etwa 10 FSU, und negative und hochpositive Proben sich um etwa 100 FSU unterscheiden sollten.

ERGEBNISSE

Zur Standardisierung des FIAX wurden Verdünnungsreihen von Standardproteinlösungen verwendet, die IgG-Konzentrationen zwischen 50 und 2000 ng/ml enthielten. Die FSU für verschiedene Konzentrationen ergaben Eichkurven, die für die unterschiedlichen Versuchsbedingungen erstellt wurden. Als Kontrolle wurde ein Proteingemisch (Ferritin, Rinderalbumin, b-Lactoglobulin, Conalbumin, Pferde-Myoglobin, Myoglobin vom Wal, Ribonuclease und Cytochrom C) mit der Konzentration 1000 ng/ml verwendet.

1. Beschichtung des Cellulose-Trägers mit anti-human-IgG

Eine Adsorption von Antikörpern an den Cellulose-Träger kann durch zwei Verfahren erreicht werden. Bei der ersten Möglichkeit wird die Reaktionszone in ausreichendem Volumen der Antikörper-Lösung eingetaucht und unter ständigem Schütteln 30 Minuten inkubiert. Alternativ dazu wird die Reaktionszone des Stiqs mit einem Tropfen Antikörper-Lösung beschichtet und flach liegend bei Zimmertemperatur getrocknet.

Die genauen Versuchsbedingungen waren:

Die Stiqs wurden in Antikörper-Lösung (200 µg/ml) bei 20° C 30 Minuten geschüttelt, oder 25 µl der Lösung wurden auf die Stiqs getropft und für 2 h getrocknet. In beiden Fällen wurden die Stiqs anschließend in PBS/TWEEN 20 0,05 % gewaschen, danach in Verdünnungen von IgG-Standard-Protein (2000 - 31; 0 ng/ml) sowie des Kontrollproteingemisches (1000 ng/ml bzw. 2000 ng/ml) 30 Minuten geschüttelt und darauf erneut in Waschpuffer geschüttelt. Als FITC-markierter Antikörper wurde DAKO FITC-anti-human-IgG (1:50 verdünnt) eingesetzt. Nach Schütteln in dieser Lösung wurde erneut wie bisher gewaschen, und die Stiqs nach 10 Minuten im Fluorometer ohne und mit Verstärkung gemessen.

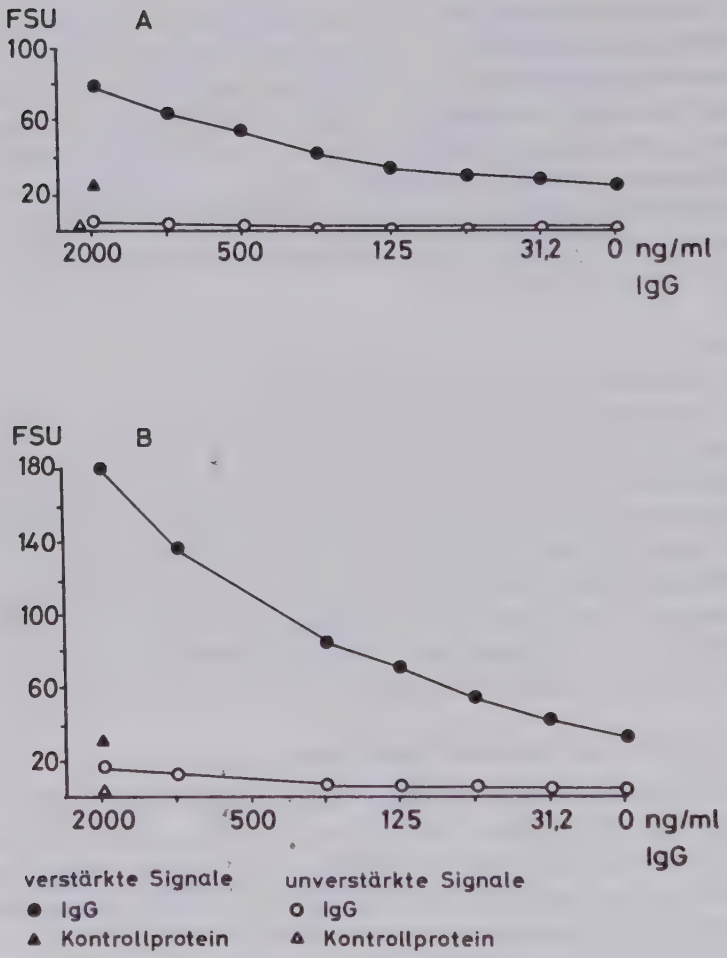

Abb. 2 Vergleich von Eichkurven nach Beschichtung von Celluloseacetatträgern durch
A. Inkubation in Antikörper-Lösung (anti-human-IgG [200 µg/ml])
B. Tropfen der Antikörper-Lösung ("spotting"; 5 µg anti-human-IgG/Stiq)

Beim Vergleich beider Beschichtungsarten fanden sich höhere FSU, wenn die Stiqs durch Tropfen beschichtet ("gespotted") wurden (Abb. 2). Bei höchster Antigen-Konzentration (2000 ng IgG/ml) lag der pregain bei Inkubation der Stiqs in anti-human-IgG bei 4 FSU, im Vergleich zu 16 FSU nach der "spotting"-Methode. Durch Verstärkung ließ sich im ersten Falle maximal ein Signal von 80 FSU erreichen, beim Spotten dagegen 180 FSU. Die Eichkurve der in Lösung inkubierten Stiqs hat eine zu geringe Steigung, so daß verschiedene Konzentrationen an IgG schlecht diskriminiert werden könnten.

2. Ermittlung der optimalen anti-IgG-Konzentration

Zur Bestimmung der optimalen anti-IgG-Konzentration für die Beschichtung des Celluloseacetatträgers wurden in 3 Versuchen Konzentrationen zwischen 50 - 2000 µg/ml (entsprechend 1,25 - 50,0 µg/Stiq) verwendet. Die IgG-Konzentrationen lagen zwischen 50 und 5000 ng/ml. Eine gute Differenzierung von pregain und gain-Signalen war bei niedrigen Konzentrationen (50 - 250 µg/ml ≙ 1,25 - 6,25 µg/Stiq) möglich (Abb. 3). Mit steigender Konzentration von anti-human-IgG erhöhte sich der pregain und ließ sich bei Verwendung einer Konzentration von 1000 µg/ml (25,0 µg/Stiq) kaum noch verstärken. Bei 2000 µg/ml (50,0 µg/Stiq) lagen die gain-Signale immer über 180 FSU. In den folgenden Versuchen wurde daher die Konzentration 200 µg/ml (5,0 µg/Stiq) verwendet.

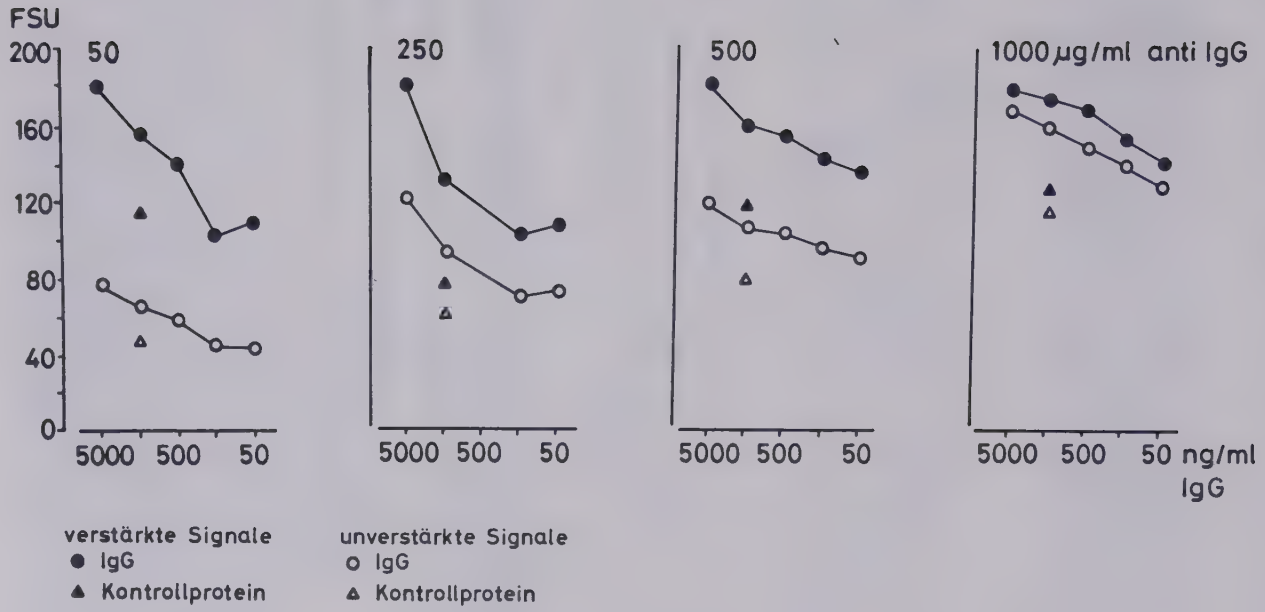

Abb. 3 Abhängigkeit der Fluoreszenz-Signale von der Beschichtung der Celluloseacetat-Oberfläche mit verschiedenen anti-human-IgG-Konzentrationen (50 - 1000 µg/ml; gespotted)

3. Einfluß eines Zusatzes von TWEEN 20 bzw. BSA zum Waschpuffer

Da die unverstärkten FSU (pregain) bereits bei Verwendung einer niedrigen Konzentration von anti-human-IgG (200 µg/ml) über der oberen Grenze von 50 FSU lagen, wurde in 3 Versuchen untersucht, ob durch Zusatz von TWEEN 20 (0,05 - 0,2 %) zum Waschpuffer eine Erniedrigung der pregain-Signale zu erreichen war.

Es zeigte sich, daß in Gegenwart von 0,05 % TWEEN im Waschpuffer die unverstärkten Signale deutlich erniedrigt waren. Durch Erhöhung der TWEEN-Konzentration ließ sich keine wesentliche weitere Erniedrigung erreichen. Das Kontroll-Proteingemisch ergab 24 FSU. Damit lag die untere Nachweisgrenze für IgG bei 100 ng/ml (Abb. 4c).

In den bisherigen Versuchen wurde das TWEEN nur im 2. und 3. Waschgang zugesetzt. In den Waschpuffern befand sich außerdem Rinder-Serumalbumin (BSA; 0,2 % - 1,0 %), das sich an noch freie Bindungsstellen der Celluloseacetatoberfläche setzt.

In einem Versuch wurde in allen drei Waschpuffern ausschließlich TWEEN verwendet, um dadurch möglicherweise eine weitere Erniedrigung der pregain-Signale zu erreichen.

Bei allen verwendeten TWEEN-Konzentrationen, die zwischen 0,2 % und 0,05 % variierten, fand sich eine deutliche Erniedrigung der pregain-Signale. Der Vergleich mit Eichkurven, die unter Verwendung von BSA-haltigen Waschpuffern erstellt wurden, machte deutlich, daß die ausschließliche Verwendung von TWEEN in allen Waschpuffern die pregain-Signale auf optimale Werte zwischen 20 - 30 FSU brachte. Die Leerwert-Signale (IgG 0 ng/ml) entsprachen denen der Vergleichsproteine (Abb. 4a, b, c). Als geeignetste Konzentration erwies sich TWEEN 0,05 % in allen Waschpuffern. Die untere Nachweisgrenze für IgG lag damit zwischen 50 und 100 ng/ml.

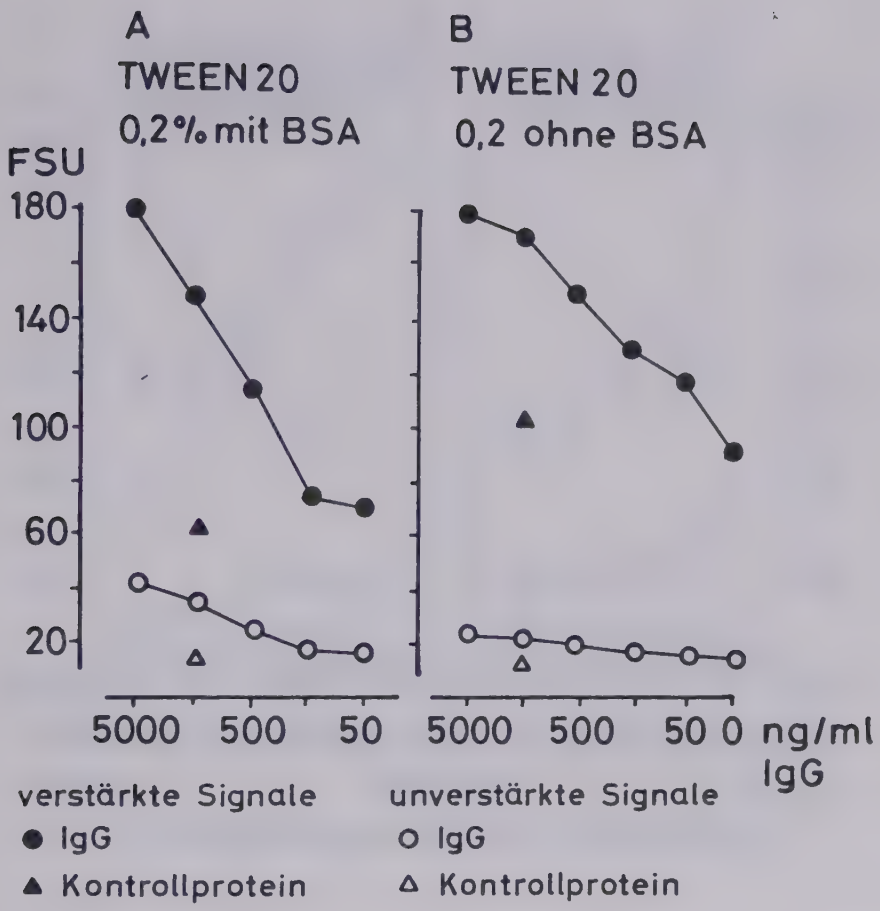

Abb. 4a Einfluß eines Zusatzes von TWEEN 20 zum Waschpuffer auf die Höhe der FSU und die Möglichkeit einer Differenzierung von IgG-Konzentrationen.
A. Verwendung von TWEEN 20 0,2 % im BSA-haltigen Waschpuffer (BSA 0,2 % bzw. 1 %)
B. Verwendung ausschließlich von TWEEN 20 0,2 % in allen Waschpuffern

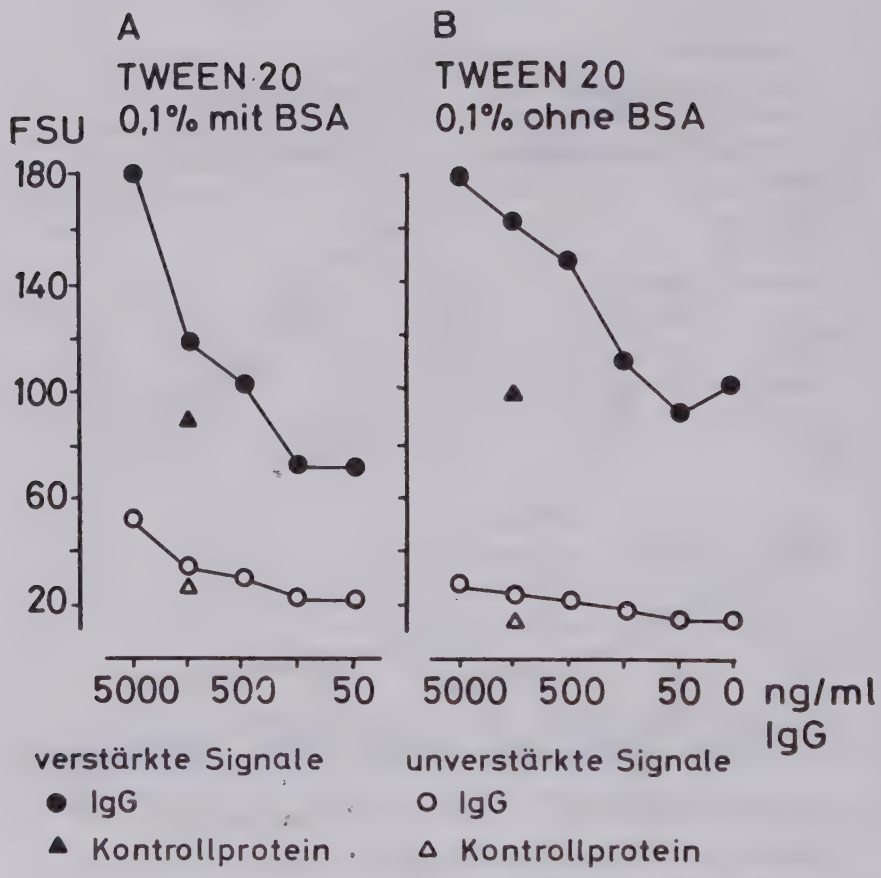

Abb. 4b Einfluß eines Zusatzes von TWEEN 20 zum Waschpuffer auf die Höhe der FSU und die Möglichkeit einer Differenzierung von IgG-Konzentrationen.
A. Verwendung von TWEEN 20 0,1 % im BSA-haltigen Waschpuffer (BSA 0,2 % bzw. 1 %)
B. Verwendung ausschließlich von TWEEN 20 0,1 % in allen Waschpuffern

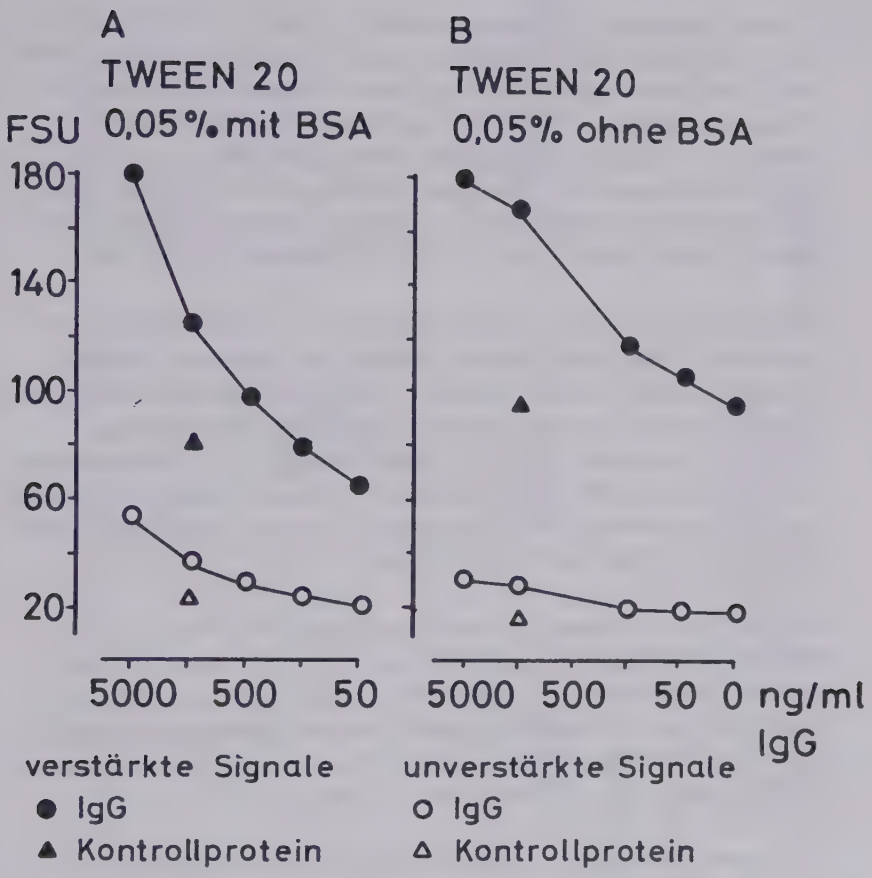

Abb. 4c Einfluß eines Zusatzes von TWEEN 20 zum Waschpuffer auf die Höhe der FSU und die Möglichkeit einer Differenzierung von IgG-Konzentrationen.
A. Verwendung von TWEEN 20 0,05 % im BSA-haltigen Waschpuffer (BSA 0,2 % bzw. 0,1 %)
B. Verwendung ausschließlich von TWEEN 20 0,05 % in allen Waschpuffern

4. Einfluß der Inkubationszeiten

In den bisherigen Versuchen wurden folgende Inkubationszeiten verwendet: Die gespotteten Stiqs wurden zunächst 10 Minuten gewaschen, danach 30 Minuten in den IgG-Eichlösungen inkubiert, erneut 10 Minuten gewaschen, 30 Minuten in der Lösung von FITC-markiertem Antikörper inkubiert, und abschließend nochmals 10 Minuten gewaschen. Wieviel von den jeweiligen Reaktionspartnern (IgG bzw. FITC-anti-human-IgG) gebunden wird, hängt direkt von der Inkubationszeit ab.

Durch Variation der Inkubationszeiten in beiden Reaktionsschritten sollte ausgetestet werden, mit welcher Kombination die besten Resultate erzielt würden. Variiert wurde die Inkubationszeit der gespotteten Stiqs mit IgG-Lösungen (30 und 60 Minuten) und die Inkubationszeit im FITC-markierten Antikörper (30 und 60 Minuten); die Zeiten wurden dabei verschieden miteinander kombiniert. Die drei Waschgänge dauerten wie bisher jeweils 10 Minuten.

Wie Abbildung 5 zeigt, ergaben sich bei den verschiedenen Kombinationen ähnliche Eichkurven. Bei 30 Minuten Inkubation der IgG-Lösung sowie der FITC-anti-human-IgG-Lösung fand sich ein annähernd linearer Verlauf der Eichkurve mit optimaler Steigung, so daß sich hochpositive und niedrigpositive Proben gut differenzieren ließen.

Mit zunehmenden Inkubationszeiten nahm die Steigung ab. Es wurde mehr IgG bzw. FITC-markierter Antikörper gebunden, was vor allem bei den kleinen Konzentrationen zu einer Erhöhung der Signale führte.

Bei den folgenden Versuchen wurden Inkubationszeiten von je 30 Minuten wie bisher verwendet.

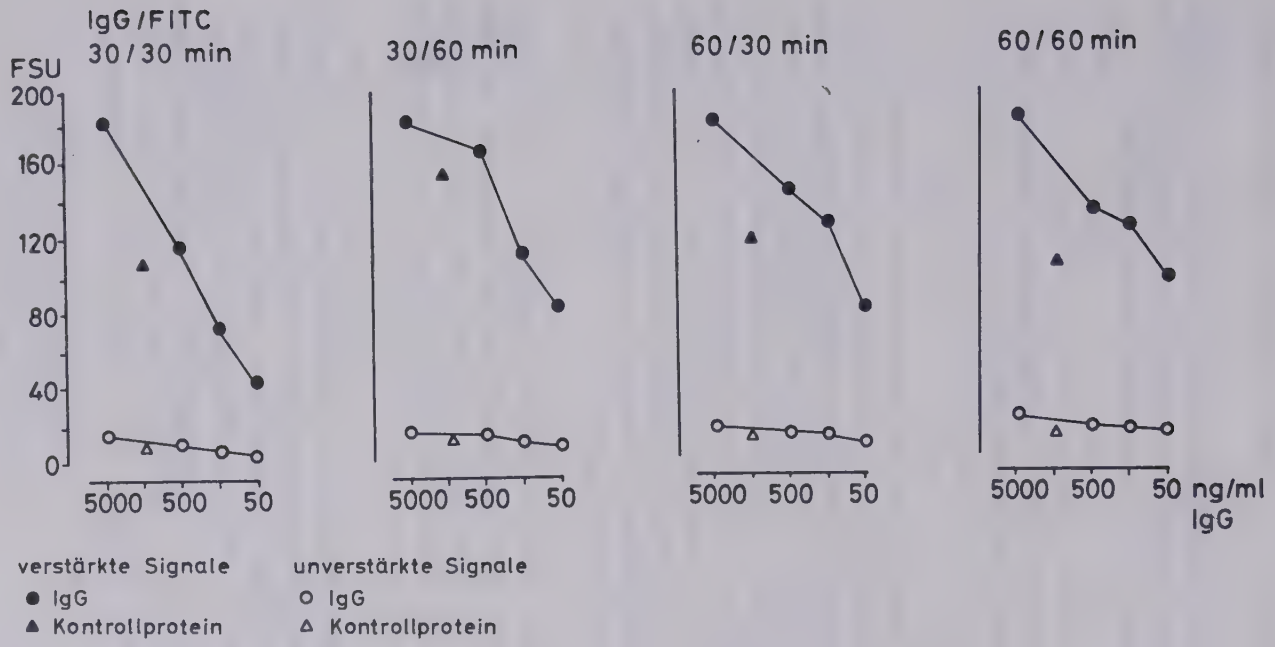

Abb. 5 Vergleich von verschiedenen Kombinationen von Inkubationszeiten mit IgG-Lösungen (IgG) und FITC-markiertem anti-IgG (FITC).
IgG/FITC 30 Min./30 Min.; IgG/FITC 30 Min./60 Min.;
IgG/FITC 60 Min./30 Min.; IgG/FITC 60 Min./60 Min.

5. Austestung des optimalen FITC-markierten Antikörpers

Die Höhe der Fluoreszenz-Signale wird von der Bindungsrate des FITC-markierten Antikörpers an die bereits auf dem Stiq befindlichen Antikörper-Antigen-Komplexe bestimmt.

Durch Verwendung eines geeigneten Präparats in optimaler Konzentration sollten die unspezifischen Bindungen möglichst niedrig gehalten werden und damit die pregain-Signale weiter erniedrigt werden.

Zu diesem Zweck wurden die unspezifischen Bindungen von 8 verschiedenen FITC-anti-human-IgG- bzw. FITC-anti-human-Ig(GAM)-Konjugaten parallel getestet. Die Konjugate stammten von Kaninchen, Ziege und Schaf und hatten molare F/P-ratios zwischen 2,0 und 4,3. Es wurden unbeschichtete Stiqs in der 1/100 verdünnten FITC-Antikörper-Lösung 30 Minuten inkubiert. Das danach gemessene Signal war ein Maß für die Höhe der unspezifischen Bindung. Die niedrigsten pregain-Signale wies hierbei das Präparat von DAKO auf (FITC-anti-human-IgG vom Kaninchen, F/P 2,3).

Der Vergleich zweier Eichkurven, die unter gleichen Bedingungen erstellt wurden, zeigt, daß die Verwendung von DAKO Antiserum, 1/50 verdünnt, die pregain-Signale weiter senkt, und - wie die verstärkten Signale zeigen - einen annähernd linearen Verlauf der Eichkurve bewirkt (Abb. 6A).

Im Vergleich dazu lagen die pregain-Signale bei Verwendung von BEHRING Antiserum (FITC-anti-human-IgG, von der Ziege, F/P 3,2, 1/100 verdünnt) relativ hoch; die Eichkurve hatte eine für eine ausreichende Diskrimination der IgG-Konzentrationen zu geringe Steigung und unterlag größeren Schwankungen (Abb. 6B). In allen weiteren Versuchen wurde daher das Präparat von DAKO, 1/50 verdünnt in PBS, verwendet.

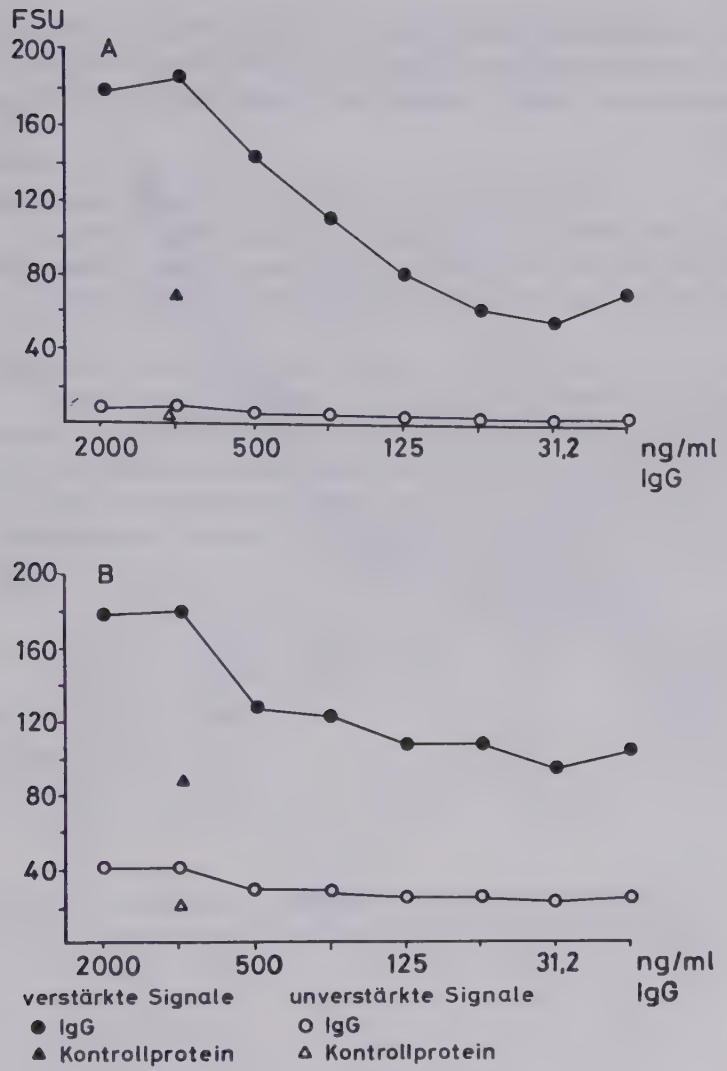

Abb. 6 Einfluß des FITC-Antiserums auf den Verlauf der Eichkurve. Verwendung von
A. DAKO FITC-anti-human-IgG, 1/50 verdünnt
B. BEHRING FITC-anti-human-IgG, 1/100 verdünnt

6. Vergleich von Standard-IgG und reinem IgG

Zur Herstellung der Eichkonzentrationen wurde bisher ein Standard-IgG-Präparat verwendet. Der Standard ist aus menschlichem Serum gewonnen und enthält außer IgG noch andere Proteine.

Um sicherzustellen, daß die Fluoreszenz-Signale ausschließlich gebundenes Immunglobulin G wiedergeben, wurden Verdünnungen eines IgG-Standard-Präparates, eines Präparates mit reinem IgG und der Kontroll-Proteinmischung getestet.

Die Eichkurven beider IgG-enthaltenden Lösungen stimmten über den gesamten Konzentrationsbereich gut überein (Abb. 7). Dagegen blieben die Signale für die Kontrollproteine über den gesamten Bereich konstant niedrig. Die Fluoreszenz-Signale der IgG-Lösungen konnten bis zu einer Konzentration von 62 ng/ml von den Signalen des Kontrollproteins differenziert werden.

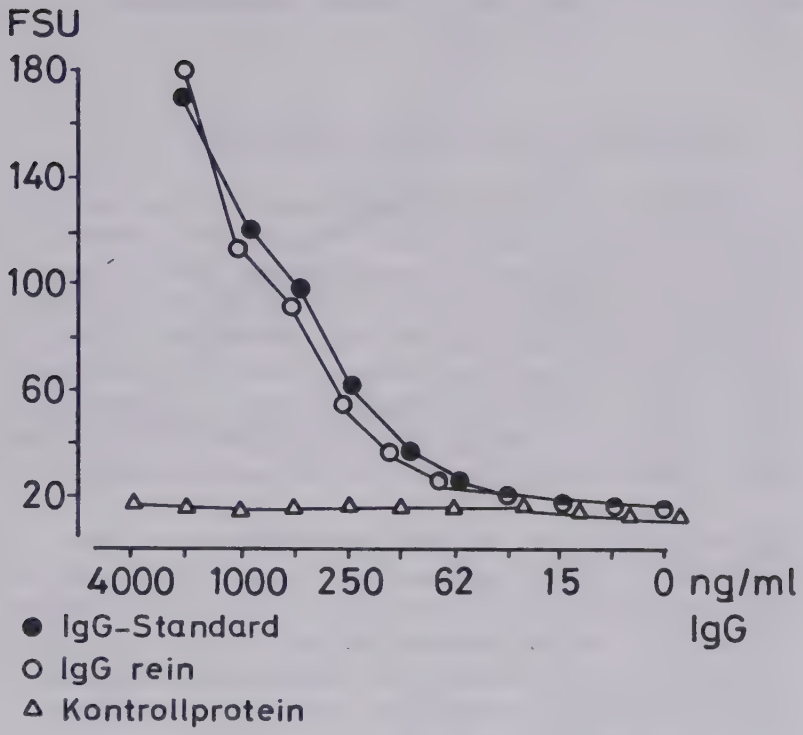

Abb. 7 Vergleich von Eichkurven, die mit Verdünnungen zweier verschiedener IgG-Präparate erstellt wurden

7. Einfluß des Kulturmilieus auf die Eichkurve

Da die IgG-Konzentrationen von Lymphozyten-Überständen gemessen werden sollten, mußte getestet werden, ob das Milieu der Kulturüberstände die Eichkurven beeinträchtigt.

7.1 Eichkurven in kulturadaptierten Lösungen

Die Lösungen, in denen die Lymphozyten kultiviert werden, bestehen aus Kulturmedium (RPMI), Foetalem Kälberserum (FCS) und teilweise auch Pokeweed Mitogen (PWM). Da es sich hierbei um Proteine handelt, konnte es möglicherweise zu unspezifischen Bindungen mit den Antikörpern auf dem Stiq kommen. Um dies auszuschließen, wurde in einem Versuch Standard-IgG in einer Lösung verdünnt, die RPMI/FCS enthielt, und einer Lösung, die RPMI/FCS/PWM (1 %) enthielt. Diese Lösungen waren zuvor mit PBS 1:2 verdünnt worden.

Wie der Vergleich mit Standard-IgG-Verdünnungen in PBS zeigt (Abb. 8A und B), ergaben sich keine wesentlichen Veränderungen der Eichkurve. Die Steigung blieb in beiden Fällen erhalten, die Kurven waren weitgehend linear, und die IgG-Konzentrationen konnten bei beiden Kurven gut differenziert werden. Die Signale der Kontrollproteinlösungen entsprachen denen der Leerwerte.

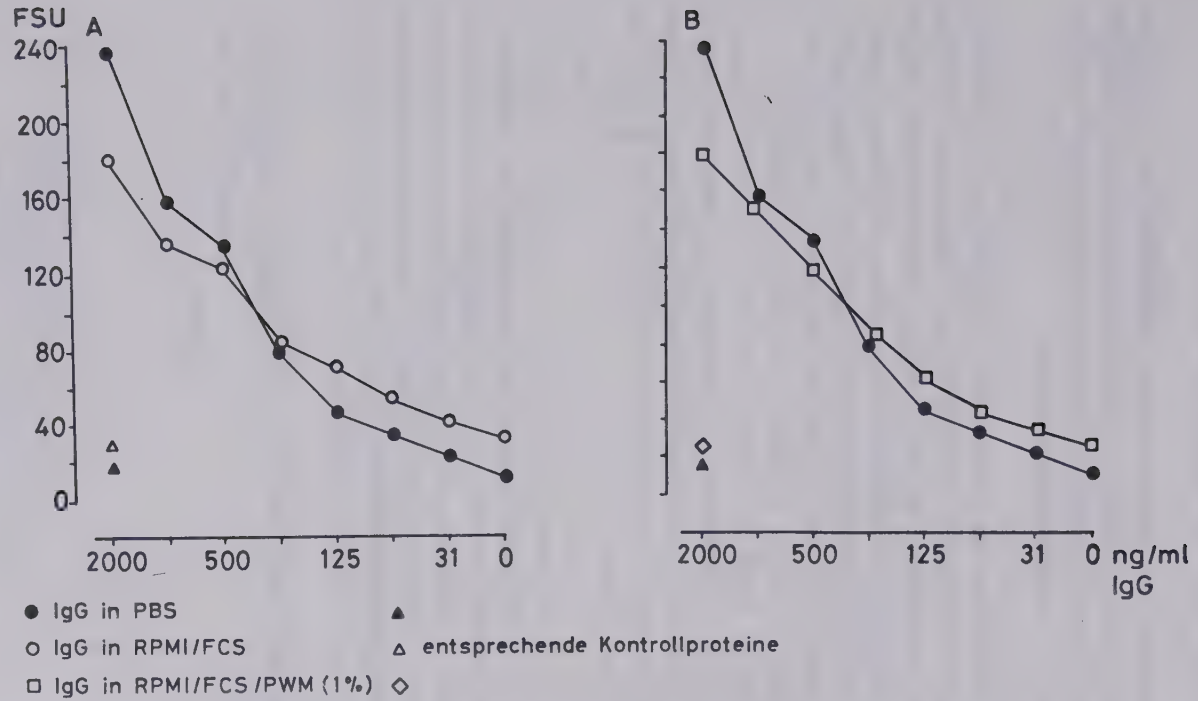

Abb. 8 Vergleich von Eichkurven in kulturadaptierten Lösungen
A. IgG in PBS und in RPMI/FCS
B. IgG in PBS und in RPMI/FCS/PWM (1 %)

7.2 Verwendung von doppelseitigen Stiqs

In einem weiteren Versuch wurden zusätzlich zur Erstellung der Eichkurve in Kulturmilieu-adaptierten Lösungen einseitig und beidseitig mit Celluloseacetat beschichtete Stiqs parallel im Doppelansatz getestet.

Durch Verwendung von sogenannten "Doppelstiqs" konnte eine unspezifische Bindung von Proteinen (insbesondere FITC-markierter Antikörper) an der nicht mit anti-human-IgG gespotteten Seite des Stiqs von der spezifischen Bindung an der gespotteten Seite differenziert werden. Die Signale der nicht gespotteten Seite sind der sogenannte "Background".

Abbildung 9A zeigt die gemittelten Werte aus dem Doppelansatz für IgG in RPMI/FCS (1:3 verdünnt in PBS) und für IgG in RPMI/FCS/PWM (1 %) bei Verwendung von Einfachstiqs; Abbildung 9B die entsprechenden Werte bei Verwendung von doppelseitigen Stiqs.

Es zeigte sich, daß es an der nicht gespotteten Seite zu keiner unspezifischen Bindung von Proteinen bzw. FITC-markiertem Antikörper kam; der "Background" lag niedriger als alle IgG-Konzentrationen. Bei der Messung von Kulturüberständen mit ihrer unterschiedlichen Proteinzusammensetzung ermöglicht daher die Verwendung von "Doppelstiqs" eine Erfassung unspezifischer Reaktionen.

Die Eichkonzentrationen konnten bis 31 ng/ml differenziert werden.

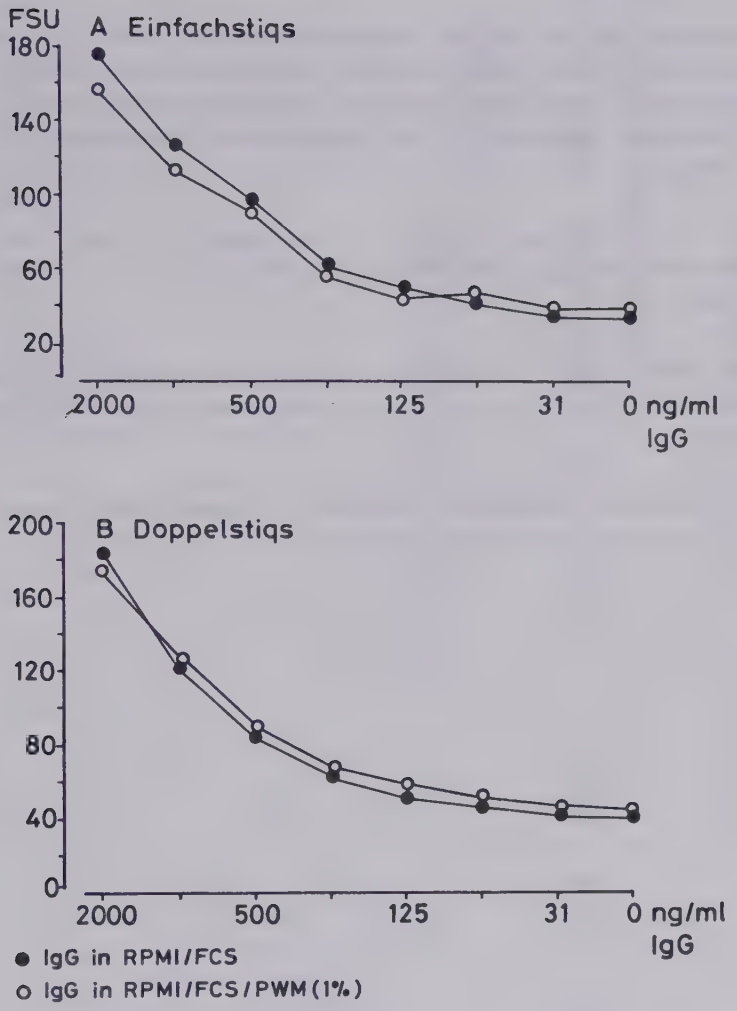

Abb. 9 Vergleich von Eichkurven, die in Kulturmilieu erstellt wurden.
A. Verwendung von Einfachstiqs
B. Verwendung von doppelseitigen Stiqs
Die Werte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar.

7.3 Ermittlung der optimalen Arbeitsverdünnung

In einem letzten Versuch wurde die optimale Arbeitskonzentration, das ist die Verdünnung der Kulturmedien in PBS, ermittelt. Diese Verdünnung war notwendig, da die Menge an vorhandener Meßlösung in den Lymphozyten-Überständen sehr gering war.

Auf den Eichstufen 2000 ng/ml, 1000 ng/ml, 500 ng/ml und 250 ng/ml wurden Verdünnungen mit PBS von 1:1 bis 1:100 angesetzt.

Wie Abbildung 10 zeigt, war eine ausreichende Diskrimination der Konzentrationen bis zur Verdünnung 1:3 gewährleistet.

Als optimale Verdünnungsstufe für die Kulturmedien ergab sich eine 1:2 Verdünnung mit PBS.

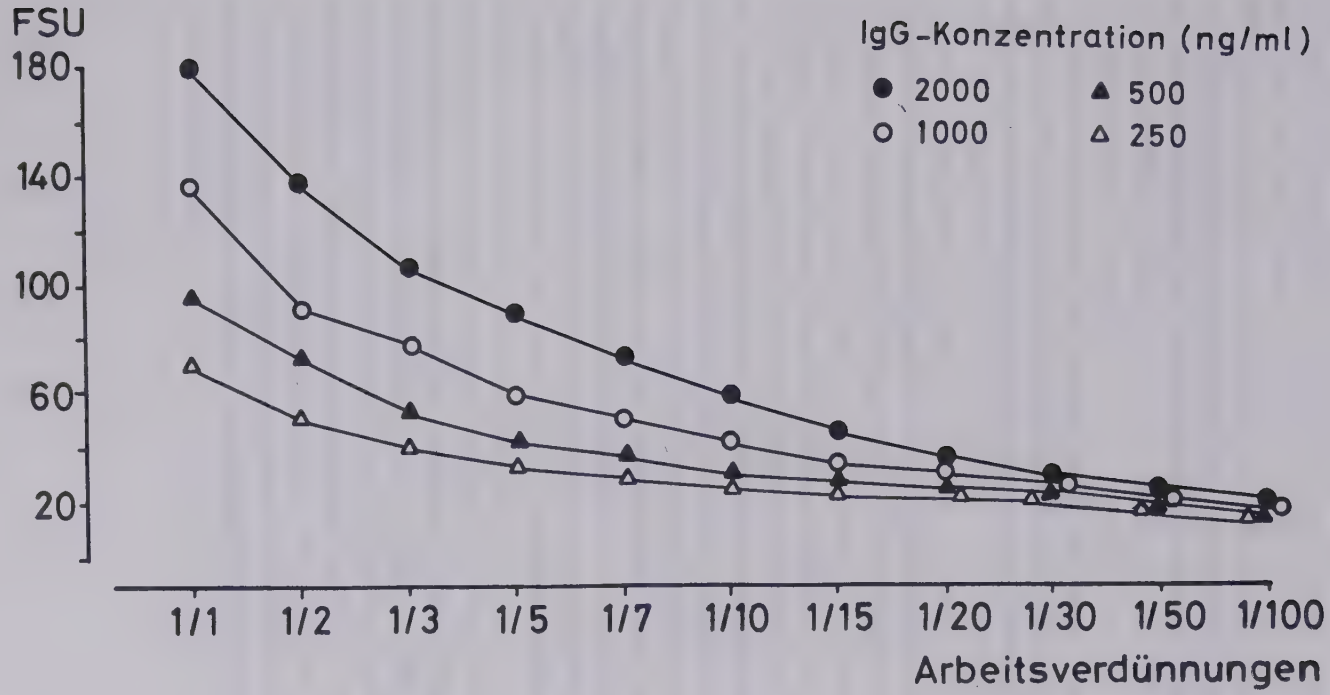

Abb. 10 Ermittlung der optimalen Arbeitsverdünnung

DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, experimentelle Bedingungen für einen neuen quantitativen fluoreszenzimmunologischen Assay als Ersatz des RIA festzulegen, die die Messung von IgG in Kulturüberständen PWM-stimulierter Lymphozyten ermöglichen.

Dabei waren eine Reihe von Parametern zu berücksichtigen, die in den dargelegten Versuchen so ausgetestet wurden, daß eine für unsere Bedingungen optimale Eichkurve erzielt wurde.

So war es erforderlich, eine untere Nachweisgrenze im ng-Bereich zu erreichen, da die IgG-Konzentrationen in den Überständen sehr niedrig lagen. Wichtig war auch, nachzuweisen, daß die Messung für IgG spezifisch war; da in den Meßlösungen viele verschiedene Proteine vorhanden sind, mußte ausgeschlossen werden, daß diese unspezifische Bindungen mit den an dem Stiq befindlichen Immunproteinen (IgG und FITC-anti-human-IgG) eingingen, was sich in einem erhöhten Fluoreszenz-Signal niedergeschlagen hätte. Es war auch möglich, daß Immunglobuline anderer Klassen gebunden würden. Ebenso konnten BSA-haltige Waschpuffer die Fluoreszenz-Signale erhöhen.

Zunächst wurde ein in dieser Hinsicht günstiger Waschpuffer ermittelt. Es ergab sich, daß bei der ausschließlichen Verwendung von TWEEN 20 in allen Waschpuffern die Signale vor allem der unerwünschten Background-Aktivität deutlich absanken, und die Differenzierungsmöglichkeit zwischen positiven und negativen Resultaten verbessert werden konnte. TWEEN 20 als oberflächenaktives Reagens konnte im Gegensatz zu dem Protein BSA keine unspezifischen Bindungen eingehen.

Bei der Austestung des optimalen FITC-Antikörpers wurde angenommen, daß Präparate mit hohem F/P-Quotienten (d.h. hohem molarem Verhältnis des gebundenen Fluoreszeins zu Protein), die Fluoreszenz-Signale erhöhen und dadurch vermehrt spezifische Bindungen erfaßt würden. Dagegen erwies sich jedoch ein Präparat am geeignetsten mit einem relativ niedrigen F/P-Quotienten, der bei dem von uns verwendeten DAKO FITC-Antiserum 2,3 betrug.

Sundeen und Krakauer (1979) fanden in ihrem Festphasen-Immunfluoreszenz-Assay zur Messung von IgM in Kulturüberständen gute Ergebnisse bei Verwendung von Präparaten mit F/P-Quotienten zwischen 2,1 und 4,2. Auch bei ihnen stellte sich die Frage nach einem linearen Meßbereich bei niedrigen Konzentrationen und die Verwendung geringer Probevolumina.

Bei der Bestimmung der optimalen Reaktionszeit für die Inkubation in IgG-Lösung und FITC-Antikörper-Lösung wurde mit jeweils 30 Minuten das beste Ergebnis erzielt. Längere Inkubationszeiten erhöhen die Signale vor allem bei den niedrigen Konzentrationen. Dagegen finden sich beim Festphasen-Radioimmunoassay (Plauth 1981) sehr viel längere Inkubationszeiten: die Kopplung des Festphasen-Antikörpers (anti-human-IgG) dauert 24 Stunden, die erste Inkubation (Bindung des zu bestimmenden Immunglobulins) 12,5 Stunden, und die zweite Inkubation (Bindung des radioaktiv markierten Anti-Immunglobulintracers) 1,5 Stunden. Der Radioimmunoassay erstreckt sich somit über mehrere Tage, während die Gesamtdauer des FIAX-Tests bei den verwendeten Inkubationszeiten einschließlich Messung 4 Stunden beträgt.

Ein weiterer Vorteil der Anwendung des FIAX-Systems gegenüber dem RIA besteht darin, daß keine radioaktiven Substanzen verwendet werden, was die praktische Handhabung wesentlich erleichtert.

Zur Spezifitätskontrolle wurden die Signale zweier Eichkurven verglichen, die von Eichlösungen verschiedener IgG-Präparate stammten. In der einen Reihe befanden sich Verdünnungen eines IgG-Standards. In diesem Präparat ist IgG zwar angereichert, es enthält darüber hinaus aber auch andere Immunglobuline. In der anderen Reihe befanden sich Eichlösungen, die ausschließlich IgG enthielten. Die Signale der beiden Reihen waren annähernd gleich. Man konnte daher annehmen, daß keine weiteren Immunglobuline bzw. Proteine neben IgG gebunden wurden.

Die weiteren Tests wurden in Eichlösungen vorgenommen, welche an das Kulturmilieu angeglichen waren. Auch hier wurde die Eichkurve durch die in der Lösung vorhandenen Proteine nicht verändert.

Die Höhe der unspezifischen Bindungen wurde zunächst durch ein Kontrollprotein angegeben. Dessen Signale lagen zunächst sehr hoch (zwischen 100 ng/ml und 500 ng/ml), ließen sich dann aber bis auf 60 ng/ml von den IgG-Eichkonzentrationen differenzieren. Bei der Messung in Kulturmilieu entsprachen die Signale des Kontrollproteins denen des Leerwerts.

Wurden doppelseitige Stigs verwendet, so wurden diese "Background"-Signale durch den FSU-Wert der unbeschichteten Seite angegeben. Dieser lag deutlich unter dem Signal der kleinsten IgG-Konzentration und der Leerwerte. Dies bedeutet, daß der Background bei der FIAX-Methode praktisch vernachlässigt werden kann.

Im Gegensatz dazu beschreibt Plauth (1981) bei Verwendung des Festphasen-Radioimmunoassay eine Backgroundaktivität von 35 % - 45 % der maximalen Tracerbindung. Dieser Wert ist auf direkte Wechselwirkung des Tracer-Antikörpers mit dem Festphasen-Antikörper zurückzuführen.

Neben dem Radioimmunoassay wurden weitere Methoden zum Nachweis und zur Messung von in vitro gebildeten Immunglobulinen beschrieben: Hämolytische Plaque Assays, enzymgebundene Assays (ELISA) sowie Radiale Immundiffusion.

Der Hämolytische Plaque Assay wurde zunächst von Jerne und Nordin 1963 beschrieben. Bei diesem Verfahren bilden sich in einem Agar-Gel, welches Schaf-Erythrozyten enthält, hämolytische Plaques um solche Lymphozyten, die gegen eben diese Erythrozyten immunisiert worden waren. Die Lymphozyten stammten aus der Milz von Mäusen. Mit menschlichen Lymphozyten wurde dagegen das Verfahren erstmals von Fauci und Pratt 1976 erprobt; nun war es möglich, humane Immunglobulin-sezernierende Zellen in vitro zu erkennen. Es handelte sich dabei jedoch nur um IgM-produzierende Zellen, so daß der Test von verschiedenen Autoren (Molinaro et al. 1974, Eby et al. 1975, Ginsburg et al. 1978) weiterentwickelt wurde zum Protein-A-Plaque Assay, mit dem es möglich war, Zellen nachzuweisen, die Antikörper einer bestimmten Immunglobulin-Klasse sezernieren. Ein Nachteil des Plaque-Tests besteht darin, daß er zwar ermöglicht, Auskunft zu geben über das Ansprechen in vitro kultivierter Lymphozyten auf PWM durch einfaches Auszählen der Zellen, die sich im Zentrum eines hämolytischen Plaques befinden, es können jedoch keine quantitativen Aussagen über die gebildeten, in Lösung befindlichen Immunglobuline gemacht werden.

Gerade diese Möglichkeit bieten der FIAX-Test und zwei weitere Verfahren: der ELISA-Test und die Radiale Immundiffusion.

Dem ELISA-Test liegt ein ähnliches Sandwich-Verfahren wie dem FIAX zugrunde: Anti-Immunglobulin-Antikörper werden an eine feste Phase adsorbiert, danach werden in einem ersten Reaktionsschritt Antikörper (Immunglobuline) aus den Kulturüberständen gebunden, und in einem zweiten Schritt dieser Komplex mit einem Antiserum versetzt, in welchem die

Anti-Ig-Antikörper mit einem Enzym versehen sind. Es handelt sich dabei um Alkalische Phosphatase nach dem von Engvall und Perlman 1972 beschriebenen Verfahren. Gibt man nun eine Phosphatverbindung hinzu, so ist die eintretende Reaktion ein Maß für die Menge an gebundenem Immunglobulin. Da die Reaktion mit einer Farbänderung einhergeht, kann sie mit einem Absorptionsspektrometer quantitativ genau erfaßt werden.

Die hohe Empfindlichkeit des ELISA bewies Wassermann et al. 1979 mit seiner Untersuchung über den Einfluß radioaktiver Strahlung auf die T-Zell-Suppressionsfunktion. Es konnten dabei IgG-Konzentrationen zwischen 0,1 und 1,5 µg/100 ml und IgM- bzw. IgA-Konzentrationen zwischen 0,5 und 10 µg/100 ml bestimmt werden.

Kelly et al. fand 1979 in einer vergleichenden Untersuchung mit dem Hämolytischen Plaque Assay, daß der ELISA diesem an Empfindlichkeit gleichkam.

Ein wesentlicher Nachteil des ELISA besteht jedoch wie beim Radioimmunoassay in seinen langen Inkubationszeiten. Die Inkubation der festen Phase mit dem anti-Ig-Antikörper dauert 1 bis 4 Tage (Wassermann 1979) oder 1 Woche (Biberfeld 1980), die Bindung des Antikörpers 12 Stunden.

Bei der Radialen Immundiffusion werden Antikörper über ein Präzipitationsverfahren sichtbar gemacht. Die zu messende Probe wird auf eine Agar-Platte gegeben, welche das entsprechende Antigen in bekannten Konzentrationen enthält. Antigen und Antikörper begegnen einander durch Diffusion. An Stellen, wo Antigen und Antikörper in gleichen Konzentrationen vorliegen (Äquivalenzzone), kommt es zur sichtbaren Präzipitation.

Blanchard und Gardner (1978) verglichen diese Methode mit dem FIAX-Test und einem zweiten Immunfluoreszenz-Verfahren

bei der Messung von Serum-Immunglobulinen. Dabei ergaben sich große Übereinstimmung der Werte bei Messungen von IgG und IgA-Konzentrationen. Hervorgehoben wurde überdies der geringe Zeitaufwand des FIAX und die größere Objektivität der Immunfluoreszenz-Verfahren aufgrund der instrumentellen Messung. Beim FIAX-Test wird dazu ein speziell entwickeltes Fluorometer benutzt, das die Emissionsintensität der auf dem Stiq über Immunkomplexe gebundenen FITC-Moleküle in Einheiten von Fluoreszenz-Signalen umsetzt. Das Gerät weist eine außerordentlich hohe Empfindlichkeit für FITC auf: es kann weniger als 1 pg FITC nachweisen und bleibt in einem Bereich bis 1000 pg FITC linear. Es sind also Messungen in objektiven Einheiten möglich, während die Radiale Immundiffusion und auch der Hämolytische Plaque-Test nur Messungen in relativen Einheiten kennen.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß es nun auch möglich ist, das FIAX-System zur Messung von in vitro produzierten Immunglobulinen zu verwenden.

Der Test erfüllt dabei die von den Kulturen gestellten Bedingungen:
Die untere Nachweisgrenze von 30 ng/ml erlaubt die Messung sehr kleiner Mengen IgG, als Probevolumina genügen 300 µl, und der Meßbereich bleibt bis 2000 ng/ml linear.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuchsbedingungen für einen Festphasen-Fluoreszenz-Immunoassay dargestellt, die es ermöglichen, Immunglobulin G in Überständen PWM-stimulierter Lymphozyten quantitativ zu bestimmen.

Als geeignetes Verfahren für die Beschichtung des Cellulose-Trägers mit anti-human-IgG wurde das "Spotting"-Verfahren ermittelt, bei dem 25 µl Antikörper-Lösung auf den Probenträger aufgetropft werden. Als optimale Konzentration für diese Lösung fand sich 200 µg/ml. Als geeigneter Zusatz für alle Waschpuffer-Lösungen erwies sich TWEEN 20 0,05 %. Bei den Inkubationszeiten konnte eine Kombination von je 30 Minuten Inkubation in IgG-Lösung bzw. FITC-anti-IgG-Lösung als optimal ermittelt werden. Bei der Austestung des FITC-Antikörpers erwies sich ein Präparat von DAKO mit einem F/P-Quotienten von 2,3 und einer 1:50 Verdünnung in PBS am geeignetsten. Zur Spezifitätskontrolle wurden Konzentrationen von Standard-IgG und reinem IgG verglichen; dabei ergab sich eine weitgehende Übereinstimmung der Eichkurve. Bei der Erprobung des Tests in Kulturmilieu-Lösungen (bestehend aus RPMI/FCS bzw. RPMI/FCS/PWM 1 %), zeigte sich ebenfalls keine Beeinflussung der Eichkurve. Beim Vergleich von einfach- und doppelseitig beschichteten Probenträgern erwiesen sich Doppelstiqs als geeigneter. Als optimale Verdünnungsstufe für die Kulturmedien ergab sich eine 1:2 Verdünnung mit PBS.

Die untere Nachweisgrenze des Tests lag bei 31 ng/ml.

LITERATURVERZEICHNIS

Biberfeld, G.; Forsgren, M.; von Stedingk, L.-V.; Arneborn, P.: PPD-induced viral antibody production in human blood lymphocytes. Clin. exp. Immunol. 42: 364-369 (1980)

Blanchard, G.C.; Gardner, R.: Two Immunofluorescent Methods Compared with a Radial Immunodiffusion Method for Measurement of Serum Immunoglobulins. Clin. Chem. 24: 808 (1978)

Brody, J.P.; Binkley, J.H.; Harding, S.A.: Evaluation and Comparison of Two Assays for Detection of Immunity to Rubella Infection. J. Clin. Microbiol. Vol. 10, No. 5: 708-711 (1979)

Casavant, C.H.; Hart, A.C.; Stites, D.P.: Comparison of a Semiautomated Fluorescent Immunoassay System and Indirect Immunofluorescence for Detection of Antinuclear Antibodies in Human Serum. J. Clin. Microbiol. Vol. 10, No. 5: 712-718 (1979)

Catt, K.J.; Tregear, G.W.: Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes. Science 158: 1570-1572 (1967)

Coons, A.H.; Creech, H.J.; Jones, R.N.: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 47: 200 (1941)

Eby, W.C.; Chong, C.A.; Dray, S.; Molinaro, G.A.: Enumerating immunoglobulin-secreting cells among peripheral human lymphocytes. A hemolytic plaque assay for B cell function. J. Immunol. 115: 1700 (1975)

Engvall, E.; Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay for immunoglobulin G. Immunochemistry 8: 871 (1971)

Engvall, E.; Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. J. Immunol. 109: 129 (1972)

Fauci, A.S.; Pratt, K.R.: Activation of Human B Lymphocytes. I. Direct Plaque-Forming Cell Assay for the Measurement of Polyclonal Activation and Antigenic Stimulation of Human B Lymphocytes. J. Exp. Med. 144: 674-684 (1976)

Ginsburg, W.W.; Finkelman, F.D.; Lipsky, P.E.: Circulating and mitogen-induced immunoglobulin-secreting cells in human peripheral blood: Evaluation by a modified reverse hemolytic plaque assay. J. Immunol. 33: 120 (1978)

IDT International Diagnostic Technology: FIAX^{TM} 199 System Bulletin. IDT, Santa Clara, USA (1977)

Jerne, N.K.; Nordin, A.: Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. Science 140: 405 (1963)

Kelly, B.S.; Levy, J.G.; Sikora, L.: The use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and quantification of specific antibody from cell cultures. Immunology 37: 45 (1979)

Molinaro, G.A.; Maron, E.; Dray, S.: Antigen secreting cells: enumeration of immunoglobulin-allotype-secreting cells in non-immunized rabbits by means of hybrid-antibody-coated erythrocytes in a reverse hemolytic plaque assay. Proc. nat. Acad. Sci. (USA) 71: 1229 (1974)

Plauth, M.: Einfluß menschlicher Suppressorzellen auf die Mitogen induzierte Immunglobulinsynthese und Lymphozytenproliferation. Dissertationsarbeit Med. Fak. Tübingen (1981)

Ross, G.L.; Barland, P.; Grayzel, A.I.: The Immunoglobulin Class of Anti-DNA-Antibodies: Detection by a fluorometric immunoassay: Clinical and pathological correlations in SLE. J. Rheumatol. 5:4: 373-383 (1978)

Stevens, R.W.; Elmendorf, D.; Gourlay, M.; Stroebel, E.; Gaafar, H.A.: Application of Fluoroimmunoassay to Cerebrospinal Fluid. Immunoglobulin G and Albumin. J. Clin. Microbiol. Vol. 10, No. 3: 346-350 (1979)

Sundeen, J.T.; Krakauer, R.S.: A quantitative assay for low levels of IgM by solid-phase immunofluorescence. J. Immunol. Methods 26: 229-244 (1979)

Taylor, R.G.; Perez, T.R.: Serology of amebiasis using the FIAX™ System. Arch. Invest. Méd. (Mêx.) 9 (Supl. 1): 363 (1978)

Waldmann, T.A.; Broder, S.; Blease, R.M.; Durm, M.; Blackman, M.; Strober, W.: Role of suppressor cells in the pathogenesis of common variable hypogammaglobulinemia. Lancet 1974 II: 609-613

Walls, K.W.; Barnhart, E.R.: Titration of Human Serum Antibodies to Toxoplasma gondii with a Simple Fluorometric Assay. J. Clin. Microbiol. Vol. 7, No. 2: 214-235 (1978)

Wassermann, J.; von Stedingk, L.-V.; Biberfeld, G.; Petrini, B.; Blomgren, H.; Baral, E.: The effect of irradiation on T-cell suppression of ELISA-determined Ig production by human blood B-cells in vitro. Clin. exp. Immunol. 38: 366-369 (1979)

L E B E N S L A U F

Am 14. 10. 1957 wurde ich, Gudrun Brunner, als Tochter des Erwin Brunner, Steuerberater, und der Lotte Brunner, geb. Rominger, in Albstadt-Ebingen geboren. Nach der Grundschule in Winterlingen besuchte ich von 1967 bis zum Abitur 1976 das Gymnasium Ebingen. Im Oktober 1975 nahm ich am Studienbefähigungstest und am Auswahlseminar der Studienstiftung des deutschen Volkes teil. Im Wintersemester 1976/77 begann ich mein Medizinstudium an der Universität Ulm. Im Wintersemester 1977/78 setzte ich es an der Universität Tübingen fort. Im September 1983 famulierte ich am Centre Hospitalier in Aix-en-Provence. Am 17. 10. 1983 begann ich das Praktische Jahr am Kreiskrankenhaus Böblingen mit Wahlfach Kinderheilkunde und legte dort am 25. 10. 1984 den Dritten Teil der Ärztlichen Prüfung ab.
Die Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation führte ich von Mai 1980 bis Februar 1981 im Immunologischen Labor der Medizinischen Klinik Tübingen bei Herrn Prof. Dr. med. P. A. Berg durch.